ETUDE COMPARATIVE DE PLUSIEURS PHYTASES SUR LA DIGESTIBILITE DES MINERAUX CHEZ LE POULET DE CHAIR

Philipps Petra, Fidelis Fru, Raffaella Aureli

DSM Nutritional Products France, Centre de Recherche en Nutrition Animale, BP 170, 68305 Saint Louis Cedex, France

RÉSUMÉ

Le phosphore, présent dans les végétaux sous forme de phosphore phytique, est un minéral essentiel à la croissance du poulet de chair. L'augmentation du prix du phosphore pousse les nutritionnistes à utiliser des phytases afin d'améliorer la disponibilité du phosphore des plantes et ainsi réduire l'ajout de phosphore inorganique dans les rations alimentaires. Les effets de trois 6-phytases P1, P2 et P3 ont été évalués lors d'un essai de digestibilité de 22 jours chez le poulet de chair. Les poulets ont été nourris avec un aliment de base, composé de maïs et de tourteau de soja et contenant 4.4 g de phosphore total par kg. A J8 les animaux ont été répartis en 40 groupes de 8 animaux nourris avec le même aliment auquel les doses recommandées de phytase P1, P2 et P3 ont été ajoutées. Un traitement témoin positif contenant 5.1 g de phosphore total et un traitement témoin négatif (sans phytase) ont été préparés. Le gain de poids des animaux ainsi que l'indice de consommation ont été calculés entre J8 et J22 .Une collecte quantitative d'excréta a été réalisée entre J14 et J17 afin de déterminer l'utilisation totale apparente du phosphore et du calcium. A J22, les animaux ont été sacrifiés et le tibia droit de quatre animaux par groupes a été prélevé pour déterminer la résistance osseuse et le taux de cendres. Le gain de poids, l'indice de consommation et l'utilisation totale apparente du phosphore ont été significativement améliorés par l'addition de phytase par rapport au témoin négatif. Aucune différence significative n'a été observée entre les 3 différentes phytases sur ces trois paramètres. Néanmoins, l'addition de phytase P1 a permis une amélioration significative de l'utilisation totale apparente de Ca par rapport aux phytases P2 et P3 qui s'est traduite par une minéralisation osseuse significativement supérieure à P2 et P3 avec une amélioration de 19 % du taux de cendres par rapport au groupe témoin négatif.

ABSTRACT

Phosphorus is an essential mineral for growing broilers, but poorly available for monogastric animals. With increasing phosphorus cost, phytase has been shown by the nutritionist to help in releasing the phosphorus trapped in phytic acid and to reduce the inclusion of inorganic phosphorus in diets. The efficacy of three 6-phytases P1, P2 and P3 was tested on mineral utilisation of broiler chickens. From day-old until day 8, the chickens were fed a pre-experimental diet low in phosphorus. On day 8, the chickens were divided by weight into groups of 8 birds, which were allocated to the different treatments. An experimental diet based on maize and soybean meal and containing 4.4 g total phosphorus was prepared. Apart from the control treatment, the others treatments contained phytase P1, phytase P2 and phytase P3, all included in the diet at their respective recommended dose. A positive control treatment supplemented with additional dicalcium phosphate to contain 5.1 g total P per kg feed was prepared. The weight gain and the feed conversion ratio were calculated. The experiment included a period of excreta collection from day 14 to day 17 to determine mineral content. On day 22, the chickens were sacrificed, dissected and the right tibia from each of 4 chickens removed for the determination of tibia strength and ash. The three phytases tested performed equally and were found to significantly improve the growth performance and the phosphorus utilisation. However, phytase P1 demonstrated significantly better Ca utilisation and ash content (+19 %) than the other two phytases and the positive control.

INTRODUCTION

Le phosphore est un minéral essentiel à la croissance des volailles de chair. Leur alimentation est souvent supplémentée en phosphore minéral car le phosphore organique est stocké dans les végétaux sous forme d'acide phytique ou phytate. Le phosphore phytique qui représente entre 60 % et 80 % du phosphore total des végétaux n'est pas utilisable par les animaux monogastriques comme source unique de phosphore (Waldroup, 1999). En effets, ils ne possèdent pas le matériel enzymatique pour hydrolyser les phytates et libérer le phosphore nécessaire pour satisfaire leurs besoins physiologiques. Le phosphore phytique peut néanmoins être libéré en présence de l'enzyme phytase, rendant ainsi le phosphore disponible pour la croissance et la minéralisation osseuse. L'utilisation de la phytase présente le double avantage de permettre une valorisation des ressources naturelles tout en diminuant l'apport de phosphore minéral, et de réduire l'excrétion phosphorée. Au cours de ces vingt dernières années, différentes phytases microbiennes ont été développées par plusieurs entreprises de biotechnologies. Ces phytases, présentent toutes des modes d'action et des efficacités différentes.

Cette étude propose de comparer les efficacités de trois 6-phytases commerciales, sur les performances de croissance et l'utilisation du phosphore (P) et du calcium (Ca) chez le poulet de chair nourri avec un aliment déficient en phosphore. L'utilisation du P est déterminée par une mesure quantitative du P consommé et excrété.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Animaux

L'étude a été réalisée au Centre de Recherche en Nutrition Animale de DSM Nutritional Products France sur des poulets de chair (PM3). Des poulets mâles âgés d'un jour ont été élevés jusqu'à l'âge de huit jours dans des cages superposées dans une salle où la température était adaptée aux besoins spécifiques des poussins. Les animaux avaient accès à l'eau et à l'aliment *ad libitum*. A 8 jours, les animaux ont été répartis en fonction de leur poids en groupes de 8 animaux. 8 groupes d'animaux ont été attribués à chaque traitement. Les animaux et aliments consommés ont été pesés à 8, 15 et 22 jours afin de calculer le gain de poids des animaux entre J8 et J22 ainsi que l'indice de consommation.

Une collecte d'excréta a été réalisée entre le J14 et le J17. Les excréta de quatre groupes d'animaux par traitement ont été collectés en totalité pendant les quatre jours du bilan. Les excréta récoltés chaque jour ont été congelés afin de réduire les pertes gazeuses. Les animaux ainsi que l'aliment ont été pesés au début et à la fin du bilan. La quantité d'excréta récoltée a été pesée à J17 afin de déterminer la quantité totale de P et de Ca excrétée durant cette période. A la fin de l'essai (J22), les animaux ont été sacrifiés, et le tibia droit de quatre animaux provenant des mêmes groupes que ceux utilisés pour le bilan fécal a été prélevé et disséqué.

1.2. Aliment

Les animaux ont été nourris de J1 à J8 avec un aliment de base en miettes principalement composé de maïs et de tourteau de soja présentant tout deux un taux faible en phytase endogène. Afin d'induire un état de carence en P et en Ca, l'aliment a été formulé de manière à contenir 4,4 g de P total et 5,6 g de Ca par kg d'aliment. A J8, les animaux ont été nourris avec le même aliment de base sous forme de granulé dont la teneur en P total a été ramenée à 4,1 g par kg d'aliment (Tableau 1) et auquel les trois phytases P1, P2 et P3 ont été ajoutées aux doses recommandées par leurs fournisseurs respectifs. Les produits ont été volontairement incorporés en $mg.kg^{-1}$ afin de mimer les conditions pratiques d'utilisation des produits préconisées par les fournisseurs, en élevage industriel. La concentration réelle des phytases en $U.g^{-1}$ n'a donc pas été prise en compte pour calculer la quantité de produit à incorporer par kg d'aliment. La phytase **P1** (RONOZYME®NP (CT), phytase produite par *Aspergillus oryzae*) a été incluse à 150 $mg.kg^{-1}$ correspondant à 1500 U par kg d'aliment. Les phytases **P2** (phytase EC 3.1.3.26 produite par *Schizosaccharomyces pombe* (ATCC 5233) et **P3** (phytase EC 3.1.3.26 thermo protégée) ont été incluses à 100 $mg.kg^{-1}$ et 50 $mg.kg^{-1}$ respectivement, correspondant à 500 U par kg d'aliment. Un traitement témoin positif contenant 5,1 g de phosphore total a été préparé (Tableau 2). Les produits ont été ajoutés à l'aliment de base sous forme de sous-mélange afin de constituer les différents traitements. Chaque traitement a été granulé par passage dans une presse à granulés (température de granulation 70°C, filière 3x 25mm).

1.3. Analyses biochimiques

Les analyses des nutriments dans l'aliment ont été réalisées en suivant les méthodes standard classiques de détermination (VDLUFA 1976).

Après décongélation, les excréta récoltés au cours du bilan fécal ont été homogénéisés par groupe et des aliquotes représentatifs ont été prélevés pour la détermination de la matière sèche (MS) et de la concentration en P et Ca. La détermination de la teneur en P et Ca dans l'aliment et dans les échantillons d'excréta a été réalisée par spectrométrie d'émission plasma (DIN EN ISO 1998) après une minéralisation H_2SO_4/Na_2SO_4. La quantité d'aliment ingéré et la quantité d'excréta récoltés à la fin du bilan ont permis de déterminer l'utilisation totale apparente du P et du Ca, définie comme la différence entre la quantité de P ou de Ca

ingérée et celle excrétée en pourcentage de la quantité de P ou de Ca ingérée.
Les tibias prélevés ont été congelés à –20 °C jusqu'à l'analyse. Sur chaque tibia, un fragment de 2 cm de la partie centrale de la diaphyse de l'os a été découpé. Ce fragment a été débarrassé de la moelle et utilisé pour déterminer la résistance osseuse définie comme la force d'écrasement en Newton à appliquer au fragment pour atteindre le point de rupture, grâce à un appareil de type Instron (Lloyd LR10K). Le pourcentage de cendres des os a été déterminé après dégraissage des fragments d'os dans l'éthanol et dans l'éther, séchage à l'étuve à 105 °C et incinération à 550°C dans un four à moufle pendant x heures.

1.4. Analyses statistiques

Une analyse de variance à un facteur (ANOVA 1) a été utilisée afin d'évaluer statistiquement les performances de croissance (gain de poids et indice de consommation), l'utilisation totale apparente du P et Ca, la résistance osseuse et le pourcentage de cendres dans les tibias, grâce au logiciel Stat box V.5 (Grimmersoft 1995). Les moyennes significativement différentes ($p<0,05$) ont été comparées grâce au test de Newman Keuls. Si la lettre attribuée aux deux moyennes de chaque paire est identique alors la différence observée n'est pas statistiquement significative. Inversement, si la lettre attribuée aux deux moyennes de chaque paire diffère, la différence est significative.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Le détail de la composition de l'aliment de base et des valeurs analysées en nutriments et en énergie métabolisable est présenté dans le Tableau 1. Les animaux ont été nourris, après analyse, avec un aliment contenant 231 g de protéines brutes, 12,8 MJ par kg d'aliment d'énergie métabolisable et 4.4 g de P total par kg d'aliment et 5.6 g de Ca par kg. Les résultats d'analyse de l'activité des phytases dans les différents traitements alimentaires sont présentés dans le Tableau 2. L'aliment étant composé essentiellement de soja et maïs, il n'est pas étonnant de trouver une faible teneur en phytase endogène (<50 U par kg). L'activité mesurée de la phytase P1 a été plus élevée que souhaitée et réduite de 9 % après granulation. Dans le traitement contenant la phytase P2, l'activité mesurée (385 $U.kg^{-1}$) dans l'aliment en farine est inférieure à la dose cible de 500 $U.kg^{-1}$. Seulement 303 $U.kg^{-1}$ d'enzyme ont été retrouvés après granulation impliquant une perte d'activité de 22 %. Cette observation est en adéquation avec le fait que la phytase P2 a été recommandée pour une application dans un aliment en farine. En ce qui concerne la phytase P3, 611 $U.kg^{-1}$ d'enzyme ont été retrouvés dans l'aliment en farine, ce qui est supérieur au taux d'inclusion programmé. Néanmoins, une perte d'activité de 31 % a été observée après granulation. Ceci est paradoxal puisque la phytase P3 est une enzyme considérée comme étant très résistante aux températures de granulation.

Les résultats des performances de croissance des poulets de chair entre le jour 8 et le jour 22 sont présentés dans le Tableau 3. L'addition de phytase dans un aliment déficient en P a significativement amélioré le gain de poids des animaux, et ce quelque soit la phytase utilisée. L'inclusion aux doses recommandées des phytases P1, P2 et P3 a permis d'améliorer le gain de poids de respectivement 70 %, 61 % et 63 % par rapport au témoin négatif. Néanmoins la différence notée entre les trois phytases n'était pas statistiquement significative. Une amélioration du gain de poids a également été mise en évidence par Broz *et al.* (1994) et pourrait s'expliquer entre autre, par une amélioration de la digestibilité du P, ou par une augmentation de la disponibilité des protéines. Contrairement à ce qui a été décrit par Perney *et al.*, (1993), l'indice de consommation a également été significativement amélioré (de 15%) par l'addition de chaque phytase. Dans cette étude, des performances de croissance comparables ont été obtenues soit par un apport de phytase microbienne soit par un apport supplémentaire en P organique (témoin positif).
L'ajout de phytase a permis également d'améliorer significativement l'utilisation totale apparente de P (Tableau 4) par rapport aux témoins négatif et positif. Comme décrit dans plusieurs études réalisées chez le poulet de chair (Denbow et al., 1995), l'addition de phytase a permis d'améliorer significativement la disponibilité du P tout en réduisant la quantité de P excrétée puisque des réductions de 32,9 %, 24,7 % et 30,1 % ont été respectivement obtenues avec les phytases P1, P2 et P3. En augmentant la disponibilité du P les trois phytases ont également permis d'augmenter la biodisponibilité du Ca chélaté à la molécule de phytate (Sebastian *et al.*, 1996). Outre la libération de P constitutif, la phytase induira la libération des ions Ca par disparition des interactions électrostatiques et par conséquent une amélioration de l'utilisation totale apparente de Ca. L'addition de la phytase P1 a permis d'obtenir une amélioration significative de l'utilisation totale apparente de Ca de 19,6 % et 16,9 % par rapport aux phytases P2 et P3. L'augmentation de la disponibilité du P et du Ca par l'ajout de phytase s'est également traduite par une augmentation de la minéralisation osseuse (Tableau 5). Le pourcentage de cendres des tibias, qui est un bon indicateur de minéralisation, a été significativement augmenté par l'addition de phytase, quelle qu'en soit la source. L'addition de phytase P1 a permis néanmoins d'augmenter le pourcentage de cendres de 6 % et de 4 % respectivement par rapport aux phytases P2 et P3. Les effets de l'addition de phytase sur la minéralisation osseuse ont été aussi confirmés par une amélioration significative de la

résistance osseuse par rapport au témoin négatif (Broz *et al*., 1992). Comme précédemment, les effets obtenus avec la phytase P1 sont meilleurs ($p<0,05$) que ceux obtenus avec les phytases P2 et P3 de 31 % et 40 % respectivement. Ces résultats montrent le potentiel de la phytase P1 à améliorer significativement la minéralisation osseuse et par conséquent la qualité des os, non seulement par rapport aux deux autres phytases incorporées aux doses recommandées, mais aussi par rapport au témoin positif. Cependant, les effets de l'addition de phytase, dans un aliment à base de soja et de maïs déficient en P, vont dépendre de la souche de fermentation utilisée pour produire l'enzyme (Simon *et al*., 1990) et de la concentration de la phytase (Komegay *et al*., 1994). Dans notre étude, afin de reproduire les conditions pratiques d'utilisation des produits en élevage industriel, les produits ont été volontairement incorporés en $mg.kg^{-1}$ sans prendre en compte, la concentration des phytases en $U.g^{-1}$.

De ce fait, l'inclusion de la phytase P1 a été surestimée puisque 2148 $U.kg^{-1}$ ont été retrouvées après granulation au lieu de 1500 $U.kg^{-1}$. Ceci suggère que les effets significativement différents obtenus avec la phytase P1 par rapport à ceux obtenus avec les phytases P2 et P3 peuvent être en partie liés à la dose de phytase mesurée largement plus élevée que la dose recommandée.

CONCLUSION

L'addition des trois phytases microbiennes aux doses recommandées dans un aliment déficient en P, s'est traduite par une amélioration des performances de croissance liées à une augmentation significative du pourcentage de cendres aussi bien qu'à une réduction de l'excrétion phosphorée. Les phytases P1, P2 et P3, utilisées comme additif alimentaire, vont permettrent non seulement, de réduire l'addition de minéraux supplémentaires dans la ration du poulet de chair en augmentant la disponibilité des minéraux liés aux molécules d'acide phytique, mais aussi de minimiser la quantité de P excrétée. La phytase P1 s'est toutefois différenciée des deux autres phytases testées, en étant stable à la granulation et en générant des effets significatifs sur le pourcentage de cendres et la disponibilité des minéraux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Broz J., 1994. Br.Poult.Sci. 35 :273-280
Denbow D.M., 1995. Poult. Sci.74 :1831-1842
EEC, 1986, Journ.Off.d.Comm.Europ., L130, 53-54
DIN EN ISO, 1998. ISO 11885 : 1997, E22
Grimmersoft, 1995. Manuel d'utilisation
Komegay E.T., 1996. Br.J.Nutr.75:839-852
Perney, 1993.Poult.Sci.72:2106-2114
Sebastian S. ,1996.Poult.Sci.75:729-736
Simon P.C.M.,1990.Br.J.Nutr.64:525-540
VDLUFA. ,1976
Waldroup W., 1999.Poult.Sci.78 :683-691

Tableau 1 : Composition de l'aliment de base

Ingrédients (%)	
Maïs	59,65
Tourteau de soja 50 %	35,50
Huile de soja	2,40
DL-Méthionine	0,20
Phosphate bicalcique	0,28
$CaCO_3$	0,68
Sel	0,19
NaCl	0,10
Premix	1,00
Teneurs analysées:	
Protéine brute (g/kg)	231
Energie métablisable ($MJ.kg^{-1}$)	12,8
Calcium ($g.kg^{-1}$)	5,6
Total P ($g.kg^{-1}$)	4,4

Tableau 2 : Activité de la phytase dans les échantillons d'aliment

	Produit	**Dose recommandée** $mg.kg^{-1}$ / [$U.kg^{-1}$]	**Activité de la phytase** [$U.kg^{-}$] Avant Granulation	Après Granulation	**P total** $g.kg^{-1}$
A	Témoin négatif	-	-	<50	4,1
B	Phytase P1	150/1500	2379	2148	4,1
C	Phytase P2	100/500	385	303	4,1
D	Phytase P3	50/500	611	429	4,1
E	Témoin positif	-	-	-	5,1

Une unité de phytase (U) correspond à l'hydrolyse d'1µmol d'inositol phosphate à partir de 0,5Mm de phytate par minute à un pH de 5,5 et à 37°C

Tableau 3 : Performances de croissance entre J8 et J22

Produit	**Témoin négatif**	**Phytase P1**	**Phytase P2**	**Phytase P3**	**Témoin positif**
Traitement	A	B	C	D	E
Dose (Ukg^{-1})	-	1500	500	500	1 g.kg^{1}
cages x animaux	8 x 8	8 x 8	8 x 8	8 x 8	8 x 8
Gain de poids (g/animaux)	**442** ^{B} ± 59	**752** ^{A} ± 28	**710** ^{A} ± 30	**721** ^{A} ± 30	**737** ^{A} ± 50
	100	*169,9*	*161*	*162,9*	*166,6*
Aliment ingéré (g/animaux)	**700** ^{B} ± 58	**1016** ^{A} ± 39	**966** ^{A} ± 45	**976** ^{A} ± 31	**1000** ^{A} ± 50
	100	*145,3*	*138,1*	*139,5*	*142,9*
Indice de consommation (g aliment/ g gain de poids)	**1,592** ^{A} ± 0.102	**1,352** ^{B} ± 0.020	**1,360** ^{B} ± 0.026	**1,355** ^{B} ± 0.021	**1,358** ^{B} ± 0.042
	100	*84,9*	*85,4*	*85,1*	*85,3*

Tableau 4 : Utilisation totale apparente du P et du Ca entre J14 et J17

Produit	**Témoin négatif**	**Phytase P1**	**Phytase P2**	**Phytase P3**	**Témoin positif**
Traitement	A	B	C	D	E
Dose (U.kg^{-1})	-	1500	500	500	1 g.kg^{-1}
cages x animaux	4 x 8	4 x 8	4 x 8	4 x 8	4 x 8
Utilisation totale apparente du P (% ingestion)	**60,3** ^{B} ± 0,9	**73,3** ^{A} ± 1,5	**70,0** ^{A} ± 2,0	**72,1** ^{A} ± 2,6	**60,3** ^{B} ± 1,7
%	*100*	*121,6*	*116,1*	*119,6*	*100,0*
P excrété (g/kg MS excréta)	**7,3** ^{B} ± 0,3	**4,9** ^{D} ± 0,3	**5,5** ^{C} ± 0,4	**5,1** ^{CD} ± 0,3	**8,8** ^{A} ± 0,4
%	*100*	*67,1*	*75,3*	*69,9*	*120,5*
Utilisation totale apparente du Ca (% ingestion)	**36,8** ^{C} ± 2,5	**60,8** ^{A} ± 0,7	**48,9** ^{B} ± 2,5	**50,5** ^{B} ± 4,9	**53,0** ^{B} ± 2,0
%	*100*	*165,2*	*132,9*	*137,2*	*144,0*

Tableau 5 : Résistance osseuse et taux de cendres dans les tibias à J22

Produit	**Témoin négatif**	**Phytase P1**	**Phytase P2**	**Phytase P3**	**Témoin positif**
Traitement	A	B	C	D	E
Dose (U.kg^{-1})	-	1500	500	500	1 g.kg^{-1}
cages x animaux	4 x 4	4 x 4	4 x 4	4 x 4	4 x 4
Résistance osseuse (N)	**61** ^{C} ± 20,0	**223** ^{A} ± 24,8	**170** ^{B} ± 33,8	**159** ^{B} ± 18,8	**172** ^{B} ± 26,8
%	*100*	*363,5*	*276,7*	*159,4*	*279,8*
% cendres	**42,9** ^{C} ± 0,80	**51,0** ^{A} ± 0,60	**48,3** ^{B} ± 0,99	**48,9** ^{B} ± 0,74	**49,1** ^{B} ± 0,71
%	*100*	*118,9*	*112,8*	*114,0*	*114,6*